

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 21/64		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/06821
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	11. Februar 1999 (11.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04779		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1998 (30.07.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 33 341.9 1. August 1997 (01.08.97) DE 198 29 657.6 2. Juli 1998 (02.07.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: KLIMANT, Ingo [DE/DE]; Friedrich-Ebert-Strasse 32, D-93051 Regensburg (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR REFERENCING FLUORESCENCE INTENSITY SIGNALS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR REFERENZIERUNG VON FLUORESCENZINTENSITÄTSSIGNALEN

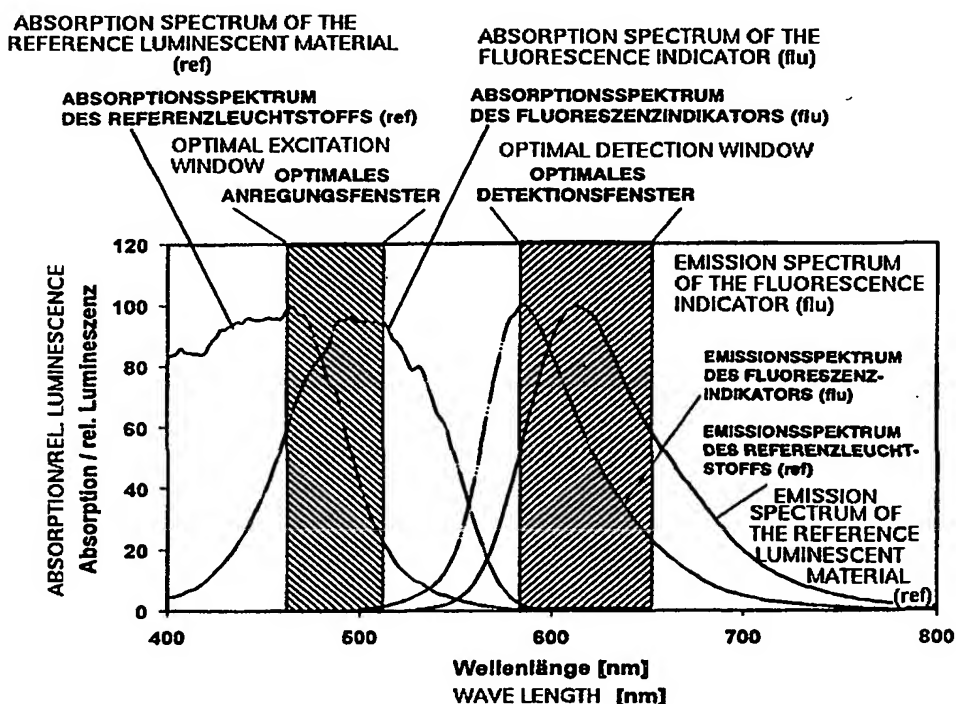
(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for the fluorometric determination of a biological, chemical or physical parameter of a sample, using at least two different luminescent materials, the first of which responds to the parameter at least as regards luminescence intensity and the second of which does not respond to the parameter as regards luminescence intensity and decay time. The luminescent materials have different decay times. The time or phase behaviour of the luminescence response obtained is used to generate a reference variable for determining a parameter.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren und eine Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe benutzt zumindest zwei verschiedene Leuchtstoffe, deren erster

zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht, und deren zweiter zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht. Die Leuchtstoffe weisen unterschiedliche Abklingzeiten auf. Das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden Lumineszenzantwort wird zur Bildung einer Referenzgröße für die Bestimmung eines Parameters herangezogen.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine in einem Spektralphotometer verwendbare Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen, chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe unter Verwendung zumindest zweier verschiedener Leuchtstoffe, deren erster zumindest in der Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und deren zweiter zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht anspricht.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein neues Konzept zur optischen Detektion von chemischen Parametern mit Hilfe von optischen Sensoren, auf der Basis von Phasenverschiebungs- und zeitaufgelösten Messungen. Die verwendeten Modulationsfrequenzen liegen zwischen 0,5 und 5 MHz und sind mit preiswerten optischen Halbleiterbauteilen erfaßbar.

Aus der Literatur und der Praxis optischer Sensoren ist bekannt, daß bei Lumineszenzmessungen die Bestimmung der Abklingzeit anstelle der Intensität als Meßgröße entscheidende praktische Vorteile aufweist. Diese Größe wird durch Schwankungen des optischen Systems nur unwesentlich oder im besten Fall überhaupt nicht beeinflußt. Sowohl Veränderungen der Intensität der Lichtquelle und der Empfindlichkeit des Photodetektors als auch Signalverluste durch Biegung von Fasern oder Beeinflussung der Signalintensität durch Veränderung der Geometrie des Sensors haben keine Auswirkungen auf das Meßsignal. Dies gilt auch für undefinierte optische Eigenschaften der Probe (wie Trübung, Eigenfärbung und Brechungsindex), die zu Problemen bei Intensitätsmessungen führen können.

Desweiteren gibt es in vielen Fällen eine weitgehende Unabhängigkeit des Meßsignals von der Konzentration des Indikators in der sensitiven Schicht. Deswegen sind Photozersetzung und Auswaschen in geringen Maßen wenig kritisch.

5

In der Literatur wurden eine Vielzahl von Meßprinzipien vorgeschlagen, um chemische Parameter auf Abklingzeitbasis zu messen. Eine der am häufigsten angewendeten Methoden ist die dynamische Lumineszenzlöschung, wobei der angeregte Zustand eines Lumineszenzindikators durch den Analyten strahlungslos deaktiviert wird. Auf dieser Grundlage erfolgt die optische Messung von molekularem Sauerstoff, sowie der Nachweis von Halogenid- und Schwermetallionen (1).

Eine weitere Möglichkeit der Deaktivierung nutzt den photoinduzierten Elektronentransfer in einem einzelnen Indikatormolekül. Bei diesem Effekt (kurz PET genannt) liegt der Lumineszenzindikator in verschiedenen Formen vor, von denen nur eine (saure Form oder mit gebundenem Metallion) hoch lumineszierend ist und eine lange Lebensdauer aufweist. In der zweiten Form (basische Form oder ohne gebundenes Metallion) besitzt der Indikator ein freies Elektronenpaar, welches den angeregten Zustand strahlungslos deaktivieren kann. Als Folge verringert sich sowohl die Abklingzeit als auch die Lumineszenzquantenausbeute. Dieses Prinzip kann Anwendung finden für die optische Bestimmung des pH-Wertes oder in der optischen Ionensensorik (2).

25

Eine weitere vorgeschlagene Möglichkeit der Abklingzeitmessung besteht darin, daß bestimmte pH-Indikatoren im protonierten und deprotonierten Zustand mit unterschiedlicher Intensität und unterschiedlicher, aber definierter Abklingzeit lumineszieren. Dabei handelt es sich z.B. um Derivate von Seminaphthofluorescein. In diesem Fall wird die Lumineszenz der sauren und der basischen Form simultan vermessen. Aus dem jeweiligen (pH abhängigen) Verhältnis der beiden Intensitäten ergibt sich dabei eine mittlere

30

- 3 -

Abklingzeit, die gemessen werden kann (3). Voraussetzung bei dieser Methode ist, daß beide Formen eines Indikators lumineszieren, und ihre Absorptions- und Emissionsspektren deutliche Überlappungsbereiche aufweisen.

5

Es ist wichtig anzumerken, daß bei den meisten der bisher zitierten Meßprinzipien die gemessenen Abklingzeiten in der Regel im Bereich von wenigen Nanosekunden liegen. Die genaue Messung von Abklingzeiten im unteren Nanosekundenbereich ist aber instrumentell sehr aufwendig und

10

erfordert neben sehr schnellen Schaltungen und hohen Modulationsfrequenzen auch schnelle Lichtquellen und Detektoren. Die Entwicklung von preiswerten Meßgeräten für diese Art von Sensoren, auf der Basis von optischen Halbleiterkomponenten wie Leuchtioden und Photodioden scheint deswegen in naher Zukunft ziemlich ausgeschlossen. Preiswerte Meßgeräte sind aber für eine weitgefächerte Anwendung optischer Sensoren unabdingbar. Deswegen besteht ein großes Interesse an Abklingzeitsensoren, deren Meßbereich sich im Bereich von Mikrosekunden oder sogar Millisekunden bewegt. Solche Sensoren wurden bisher fast ausschließlich für die optische Sauerstoffmessung bis zur Praxisreife

15

20

entwickelt, wobei Indikatoren mit Abklingzeiten bis zu einigen Millisekunden zum Einsatz kommen.

Ein kürzlich eingeschlagener Weg, neue langlebige Abklingzeitsensoren zu entwickeln, nutzt den strahlungslosen Energietransfer zwischen einem lumineszierenden Donormolekül, dessen photophysikalische Eigenschaften durch den Analyten nicht beeinflußt werden, auf einen für den Analyten sensitiven Farbindikator, der als Akzeptor bezeichnet wird. Dessen Absorptionsspektrum muß abhängig von der jeweiligen Analytkonzentration unterschiedlich stark mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen.

25

30

Als lumineszierender Donor können Übergangsmetallkomplexe mit Ruthenium(II), Ruthenium(I) oder Osmium und Iridium als Zentralatom eingesetzt werden. Diese Verbindungen zeichnen sich durch lange

Lebenszeiten (einige 100 nsec bis wenige Mikrosekunden) und hohe Quantenausbeuten aus. Dieser Weg wurde erstmalig von Lakowicz vorgeschlagen und kürzlich für optische pH-Sensoren umgesetzt, wobei die analoge Realisierung von Optoden für die $p\text{CO}_2$ -, NH_3 - und die Ionendetektion grundsätzlich möglich ist (4,5).

Ein gravierendes Problem beim praktischen Einsatz solcher Sensoren besteht darin, daß die Rate des Energietransfers und damit die meßbare mittlere Abklingzeit zum einen signifikant vom Abstand und der Positionierung von Donor und Akzeptormolekül abhängig ist, zum anderen aber auch von der Konzentration des Akzeptors in der Matrix. Aus diesem Grund führt jede Veränderung der Verteilung und des Abstands der Indikatoren in der Matrix zu Veränderungen in der Kennlinie der Sensoren. Insbesondere die Quellung der Matrix stellt ein erhebliches Problem dar.

Ein weiteres Problem ist der Einfluß von Sauerstoff auf die Sensoren. Da die Lumineszenz der eingesetzten langlebigen Donoren von Sauerstoff zum Teil beträchtlich gelöscht wird, muß die Sauerstoffkonzentration mitgemessen und das Meßsignal korrigiert werden. Zusätzlich entsteht bei diesem Prozeß in der Membran reaktiver Singlettsauerstoff, der die Photozersetzung der immobilisierten Indikatoren beschleunigt. Damit wird sowohl die Lager- als auch die Langzeitstabilität der Sensoren herabgesetzt. Damit geht natürlich einer der klassischen Vorteile der Abklingzeitmessung verloren.

Aus der US 5,102,625 ist eine Vorrichtung der eingangs genannten Art bekannt. Dort werden mittels zweier separater Meßkanäle die Intensitäten zweier Leuchtstoffe separat gemessen. Deren Intensitätsverhältnis wird als Endsignal für die Messung des Parameters verwendet. Die Abklingzeiten der Leuchtstoffe gehen in die Messung nicht ein. Die beiden Leuchtstoffe haben unterschiedliche Spektralbereiche.

- 5 -

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung des Parameters einer Probe anzugeben, das bei hoher Meßgenauigkeit mit geringerem apparativen Aufwand auskommt.

- 5 Zur Lösung der Aufgabe wird ein Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 1 und eine Vorrichtung mit den Merkmalen von Anspruch 21 vorgeschlagen.

Die Erfindung beschreibt ein neues Meßprinzip, welches die fluorometrische
10 Bestimmung verschiedener chemischer, physikalischer und biologischer Parameter mit Hilfe von zeitaufgelösten- und Phasenmodulationstechniken ermöglicht. Die Erfindung erlaubt es, das Intensitätssignal der meisten in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzsensoren durch Zumischen eines langlebigen Leuchtstoffs sehr effektiv zu referenzieren. Dazu werden zwei
15 verschiedene Leuchtstoffe gemeinsam im Sensor co-immobilisiert. Die Summe aus einem Lumineszenzsignal mit konstanter langlebiger Abklingzeit (mind. einige hundert Nanosekunden) und einem kurzlebigen Fluoreszenzsignal wird gemessen. Während die langlebige Lumineszenz in ihren Parametern vom Analyten nicht beeinflußt wird, verändert sich die
20 Intensität des co-immobilisierten kurzlebigen Leuchtstoffs in Abhängigkeit von der jeweiligen Analytkonzentration. Da die durch Phasenmodulationstechniken ermittelte Phasenverschiebung Φ_m nur vom Verhältnis der Intensitätsanteile der beiden einzelnen Leuchtstoffe abhängt, spiegelt sich in diesem Parameter direkt die Intensität des auf den Parameter
25 ansprechenden Leuchtstoffs wieder. Damit handelt es sich bei der Erfindung um ein neues Verfahren der internen Referenzierung der Signalintensität von Fluoreszenzleuchtstoffen, ohne daß eine zweite Lichtquelle oder ein zweiter Photodetektor benötigt wird. Unter der Voraussetzung, daß die Verteilung der beiden Leuchtstoffe beim Herstellungsprozess konstant gehalten wird,
30 ist Φ_m ausschließlich vom zu bestimmenden physikalischen oder chemischen Parameter abhängig, während Schwankungen im optoelektronischen

System, Verlusten in den Lichtleitern und den optischen Eigenschaften der Probe das Signal nicht beeinflussen.

Bevorzugt ist, daß beide Leuchtstoffe im gleichen Wellenlängenbereich Licht
5 absorbieren und damit mit der gleichen Lichtquelle zur Lumineszenz
angeregt werden können. Bevorzugt liegen die Emissionsspektren im
gleichen Spektralbereich. So ist es z.B. möglich, beide Leuchtstoffe mit
blauem Licht bei einer Wellenlänge von 450 nm anzuregen, wobei ein
Leuchtstoff grünes Licht bei 520 nm und der zweite rotes Licht bei 600 nm
10 emittiert, da beide Signale trotzdem mit demselben Detektor gemessen
werden können. Es ist aber auch möglich, die Lumineszenz zweier
Leuchtstoffe simultan zu messen, die sich in ihren Emissionsspektren
deutlich voneinander unterscheiden.

Das beschriebene Meßverfahren hat den Vorteil, daß der langlebige
15 Leuchtstoff keine analytspezifische Reaktion aufweisen muß, sondern einzig
als Träger eines konstanten Untergrundsignals mit langer Abklingzeit
fungiert, welches durch den kurzlebigen Leuchtstoff moduliert wird. Aus
diesem Grund kommt eine Vielzahl von in der Literatur beschriebenen
20 phosphoreszierenden Verbindungen für diesen Zweck in Frage.

Der langlebige Leuchtstoff braucht nicht mit der Probe, dem Analyten und
dem Fluoreszenzindikator in Wechselwirkung zu treten und kann deswegen
in einer Form immobilisiert werden, in der er für sämtliche
25 Probenkomponenten inert ist und damit potentielle Interferenzen durch
chemische Parameter von vornherein ausgeschlossen sind.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen
erläutert.

Figur 1 zeigt die Abhängigkeit des gemessenen Phasenwinkels Φ_m von dem
Verhältnis der Intensität des Fluoreszenzindikators und des

- 7 -

Referenzleuchtstoffes; A hohes Fluoreszenzsignal, B niedriges Fluoreszenzsignal. Es bezeichnen: flu = variables Fluoreszenzsignal; ref = konstantes Referenzsignal; ges = gemessenes Gesamtsignal;

5 Figur 2 zeigt einen berechneten Zusammenhang zwischen dem gemessenen Phasenwinkel Φ_m sowie $\cot(\Phi_m)$ und dem Amplitudenverhältnis R der beiden Leuchtstoffe;

10 Figur 3 zeigt spektrale Eigenschaften eines geeigneten Paares von Fluoreszenzindikator und Referenzleuchtstoff. Die optimalen spektralen Fenster für die Anregung des Lumineszenzsignals und die Messung des emittierten Lichtes sind schraffiert eingezeichnet;

15 Figur 4 zeigt eine zeitaufgelöste Messung des Verhältnisses der Signalintensität während des Anregungsimpulses (I_1) und während des Abklingens der Lumineszenz (I_2), wobei das Verhältnis R von der Gesamthöhe des Signals unabhängig ist und nur eine Funktion des zu bestimmenden chemischen Parameters darstellt;

20 Figur 5 zeigt pH-Calibrierkurven eines pH-Sensors nach Beispiel 1 mit unterschiedlicher Menge an HPTS (A: wenig HPTS; B: viel HPTS), gemessen als Phasenverschiebung bei einer Modulationsfrequenz von 80 kHz. Als Lichtquelle dient hier eine blaue LED und als Detektor eine Photodiode; und

25 Figur 6 zeigt vier Kombinationsmöglichkeiten des kurzlebigen chemisch sensitiven Leuchtstoffs (A) und des inerten langlebigen Leuchtstoffs (B) in einem optischen Sensor;

- 8 -

Als für den Analyten inerte Leuchtstoffe mit langen Abklingzeiten kommen z.B. in Frage:

- Übergangsmetallkomplexe mit Ruthenium (II), Rhenium (I) oder Osmium und Iridium als Zentralatom und Diiminliganden;
- phosphoreszierende Porphyrine mit Platin, Palladium, Lutetium oder Zinn als Zentralatom;
- phosphoreszierende Komplexe der Seltenerden wie Europium, Dysprosium oder Terbium;
- phosphoreszierende Kristalle wie Rubin, Cr-YAG, Alexandrit oder phosphoreszierende Mischoxide wie Magnesiumfluorogermanat

Als kurzlebige fluoreszierende Leuchtstoffe kommen alle Farbstoffe in Frage, deren Anregungs- und Emissionsspektrum mit einem der oben zitierten langlebigen Leuchtstoffe überlappt und deren Fluoreszenzintensität vom zu bestimmenden Parameter abhängig ist.

Beispiele für potentiell mögliche Leuchtstoff- bzw. Luminophor/Fluorophorpaare sind:

- Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin) / HPTS
- Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin) / Fluorescein
- Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin) / Rhodamin B
- Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin) / Rhodamin B-octadecylester
- Ruthenium(II)-(tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin) / Hexadecyl-Acridinorange
- Europium(III)-tris-theonyl-trifluormethylacetonat / Hydroxymethylcoumarin
- Platin(II)-tetraphenylporphyrin / Rhodamin B-octadecylester
- Platin(II)-tetraphenylporphyrin / Rhodamin B
- Platin(II)-tetraphenylporphyrin / Naphtofluorescein
- Platin(II)-tetraphenylporphyrin / Sulforhodamin 101
- Platin(II)-octaethylporphyrin / Eosin
- Platin(II)-octaethylporphyrin / Thionin
- Platin(II)-octaethylketoporphyrin / Nilblau
- Cr(III)-YAG / Nilblau
- Cr(III)-YAG / Naphtofluorescein

Der langlebige Leuchtstoff kann auf unterschiedliche Weise in den Sensor integriert werden (Abb. 6):

- durch direktes Lösen des Leuchtstoffs in der analytsensitiven Schicht (Fig. 6, Bsp.3)
- durch Einbau in ein Polymer, welches als Grundierung für die Sensorschicht dient (Fig. 6, Bsp. 1)
- durch Einbau in ein Polymer, welches in Mikro- oder Nanopartikeln in die sensitive Schicht dispergiert wird (Fig. 6, Bsp. 2)
- durch Einbau von lumineszierenden Farbstoffen in Sol-Gel Glas mit anschließendem Sintern, Pulverisieren und Dispergieren des Glases in der Sensorschicht (Fig. 6, Bsp. 2)
- durch Verwendung pulverisierter Phosphore, die in der sensitiven Schicht dispergiert werden (Fig. 6; Bsp. 2)
- durch Beschichtung der Außenseite einer Sensorfolie, ohne Kontakt zur Probe (Fig. 6, Bsp. 4)
- durch kovalente oder elektrostatische Bindung des Fluoreszenzindikators an die Oberfläche von Leuchtstoffpartikeln, die entweder in eine Polymerschicht dispergiert werden oder direkt in der Probe verteilt werden
- durch Dispersion von Partikeln in die Probe, in welcher der Fluoreszenzindikator in gelöster Form vorliegt.

Es ist wichtig zu erwähnen, daß mit Hilfe von Phasenmodulationstechniken bei Frequenzen im kHz-Bereich bei dieser Art von Sensoren immer nur eine mittlere Phasenverschiebung ermittelt werden kann. Ein Aufsplitten in beide Abklingzeitkomponenten ist zwar prinzipiell möglich, durch die benötigten hohen Frequenzen aber meßtechnisch aufwendig. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in den Abklingzeiten der beiden co-immobilisierten Indikatoren ergibt die zeitaufgelöste Messung, bei der nach einem Anregungslichtpuls ausschließlich das Abklingverhalten des Lumineszenzsignals nach Ausschalten des Anregungspulses ermittelt wird, in vielen Fällen keinen

nutzbringenden Parameter, da die kurzlebige Komponente zu schnell abklingt und meßtechnisch nur mit hohem Aufwand erfaßt werden kann.

Auch ist es möglich, die Signalintensität während des Anregungspulses und in der Abklingphase separat zeitaufgelöst zu messen und das Verhältnis dieser beiden Signale R zu berechnen. Wie aus Figur 4 hervorgeht, hängt dieses Verhältnis ausschließlich vom Intensitätsverhältnis R der beiden Lumineszenzkomponenten ab und ist vollständig unabhängig von der Gesamtintensität des Signals.

Desweiteren kann mit Phasenmodulationstechniken die mittlere Phasenverschiebung des Lumineszenzsignals gemessen werden. Die Meßfrequenz wird dabei auf die Abklingzeit des Leuchtstoffs abgestimmt und liegt zwischen 0,5 und 100 kHz. Wie im folgenden gezeigt wird, geht aus der Gleichung (1) hervor, daß der gemessene Phasenwinkel Φ_m nur vom Verhältnis der beiden Signalintensitäten, aber nicht von der Absoluthöhe des Signals abhängt und somit die Referenzierung der Intensität des kurzlebigen Fluoreszenzanteils ermöglicht.

Voraussetzung 1:

Additive Überlagerung der Signale (Index ref = Referenzsignal, Index flu = Fluoreszenzsignal; Index m = Meßgröße)

$$\begin{aligned} A_m \cdot \cos \Phi_m &= A_{ref} \cdot \cos \Phi_{ref} + A_{flu} \cdot \cos \Phi_{flu} \\ A_m \cdot \sin \Phi_m &= A_{ref} \cdot \sin \Phi_{ref} + A_{flu} \cdot \sin \Phi_{flu} \end{aligned}$$

Voraussetzung 2:

Die längere Abklingzeit ist sehr viel größer als die kürzere Abklingzeit:

$$\tau_{ref} \gg \tau_{flu}$$

Wenn die Modulationsfrequenz so gewählt ist, daß sie für τ_{ref} optimal ist, d.h.

$$\tan \Phi_{ref} = 2\pi \cdot f_{mod} \cdot \tau_{ref} = 1$$

ergibt sich für Φ_{flu} :

$$\tan \Phi_{flu} = 2\pi \cdot f_{mod} \cdot \tau_{flu} = \frac{2\pi \cdot \tau_{flu}}{2\pi \cdot \tau_{ref}} = \frac{\tau_{flu}}{\tau_{ref}}$$

mit der Voraussetzung ergibt sich für den Winkel Φ_{flu} :

$$\tan \Phi_{flu} = \frac{\tau_{flu}}{\tau_{ref}} \xrightarrow{\tau_{flu} \ll \tau_{ref}} 0 \Rightarrow \Phi_{flu} \rightarrow 0$$

Voraussetzung 3:

Die Abklingzeit des Farbstoffs mit der längeren Abklingzeit ist für die interessierende Messung konstant:

$$\tau_{ref} = \text{konstant} \Rightarrow \tan \Phi_{ref} = \text{konstant} \Rightarrow \Phi_{ref} = \text{konstant}$$

Damit vereinfachen sich die additiven Gleichungen zu:

$$\begin{aligned} A_m \cdot \cos \Phi_m &= A_{ref} \cdot \cos \Phi_{ref} + A_{flu} \\ A_m \cdot \sin \Phi_m &= A_{ref} \cdot \sin \Phi_{ref} \end{aligned}$$

Teilt man die erste Gleichung durch die zweite, ergibt sich:

$$\frac{A_m \cdot \cos \Phi_m}{A_m \cdot \sin \Phi_m} = \cot \Phi_m = \frac{A_{ref} \cdot \cos \Phi_{ref} + A_{flu}}{A_{ref} \cdot \sin \Phi_{ref}} = \frac{A_{ref}}{A_{ref}} \cdot \left(\frac{\cos \Phi_{ref} + A_{flu} / A_{ref}}{\sin \Phi_{ref}} \right)$$

$$\cot \Phi_m = \frac{\cos \Phi_{ref} + A_{flu} / A_{ref}}{\sin \Phi_{ref}} = \cot \Phi_{ref} + \frac{1}{\sin \Phi_{ref}} \cdot A_{flu} / A_{ref} \quad (1)$$

5

Da die Auftragung von $\cot \Phi_m$ linear das Amplitudenverhältnis widerspiegelt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Cotangens des gemessenen Phasenwinkels Φ_m und dem Amplitudenverhältnis R (und damit auch Intensitätsverhältnis) der beiden Leuchtstoffe (siehe Figur 2).

10

$\cot \Phi_m$ drückt ein Intensitätsverhältnis aus, ohne daß zwei Intensitätssignale separat gemessen werden müssen.

15 Wesentliche Vorteile sind:

- Ein sehr geringer Synthese- und Optimierungsaufwand bei der Herstellung neuer Sensoren.
- Einfache Umstellung bereits optimierter Fluoreszenzsensoren auf Abklingzeitmessung durch einfaches Zumischen des langlebigen Leuchtstoffs.
- Für ein Feld von Sensoren für unterschiedliche Analyten kann problemlos immer der gleiche langlebige Leuchtstoff verwendet werden. Damit lassen sich verschiedene Sensoren mit demselben optoelektronischen System auswerten.
- Da die Form der Kalibrierkurve nur vom Verhältnis der beiden Intensitäten abhängt, kann der Empfindlichkeitsbereich eines einzelnen Sensors allein schon durch Veränderung der zugegebenen Menge an Leuchtstoff optimiert werden.
- dasselbe kann durch eine optimale Auswahl der spektralen Fenster sowohl auf der Seite der Anregung, als auch der Emission realisiert werden.

20

25

30

- 13 -

- Die Querempfindlichkeit langlebiger Lumineszenz gegenüber Sauerstoff kann ausgeschaltet werden, indem die Indikatoren in Materialien eingebaut werden, die für Gase nicht zugänglich sind.
- Werden phosphoreszierende Feststoffe oder in Glas eingebaute Leuchtstoffe verwendet, wird jegliche Beeinflussung des Signals durch chemische Leuchtstoffparameter in der Probe vollständig ausgeschlossen.
- Weil Sauerstoff die Lumineszenz nicht löschen kann, entsteht in der Membran kein reaktiver Singlettsauerstoff. In der Folge verringert sich die Photozersetzung und die Stabilität der Sensoren verbessert sich.
- Der Einbau der langlebigen Leuchtstoffe in eine Glasmatrix oder als Feststoff verhindert deren Auswaschen vollständig. Desweiteren ist ihre Photostabilität außergewöhnlich hoch.
- Während bei Meßprinzipien, bei denen der Analyt den angeregten Zustand des langlebigen Leuchtstoffs deaktiviert (wie PET-Effekt, dynamischer Löschung oder Energietransfer), die Abnahme der mittleren Abklingzeit, immer parallel mit einer Abnahme der Signalintensität verbunden ist, was zu einer Verschlechterung des Signal/Rausch Verhältnisses führt, wird bei dieser Art von Sensoren bei Abnahme der Abklingzeit die Signalintensität größer. Die Folge ist ein wesentlich besseres Signal/Rausch Verhältnis über den gesamten Meßbereich.

Da die Kennlinie dieser Sensoren einzig vom Verhältnis der Signalanteile beider Indikatoren abhängt, sollen jedoch folgende Bedingungen erfüllt sein:

- 1) keiner der beiden Indikatoren darf im Verlauf der Messung auswaschen;
- 2) die beiden Indikatoren dürfen während der Messung nicht unterschiedlich schnell durch Lichteinwirkung zersetzt werden;
- 3) das Konzentrationsverhältnis der beiden Indikatoren muß beim Herstellen der Membranen konstant gehalten werden;
- 4) die Abklingzeit des langlebigen Leuchtstoffs muß immer konstant sein.

Für viele Sensoren können diese Bedingungen problemlos erfüllt werden.

Beispiele für optische Sensoren basierend auf diesem Prinzip:

5 **pH-Sensor**

- HPTS adsorbiert an Zellulose mit quarternären Ammoniumgruppen und eingebaut in Poly-hydroxyethylmethacrylat (PHEMA) Hydrogel
- Ru(phen)₃Cl₂ in Sol-Gel (gesintert, gemahlen und im Hydrogel dispergiert) (Figur 5 zeigt die Kalibrierkurve dieses Sensors, gemessen als Phasenverschiebung bei einer Frequenz von 80 kHz)

pH-Sensor

- 15 - Aminofluorescein kovalent gekoppelt an Sol-Gel Partikel mit eingebautem Ru(phen)₃Cl₂ (gesintert, gemahlen und in Hydrogel dispergiert)

CO₂-Sensor

- 20 - HPTS-CTA₃ Ionenpaar in Ethylcellulose gelöst mit Tetraoctylammoniumhydroxid als Puffer (nach 6)
- Ru(4,7-diph-1,10-phen) in PVC als äußere Beschichtung einer Sensorfolie

25 **NH₃-Sensor**

- Rhodamin B gelöst in PVC mit NPOE (nach 7)
- Pt(II)-tetra-pentafluorophenyl-porphyrin in PVC als äußere Beschichtung einer Sensorfolie

30

Kalium-Sensor

- lipophilisiertes Nilblau gelöst in PVC mit Weichmachern (nach 8)
- Pt(II)-octaethylketoporphyrin in PVC als äußere Beschichtung

5

Die Erfindung erlaubt somit eine optische Bestimmung eines chemischen biologischen oder physikalischen Parameters einer Probe mit Hilfe eines optischen Sensors. Im Sensor liegen zwei Lumineszenzindikatoren co-immobilisiert vor, von denen der eine Indikator als Träger eines Untergrund-

10 lumineszenzsignals fungiert, welches durch eine lange Lumineszenz-lebenszeit (vorzugsweise im Bereich von mindestens 100 Nanosekunden bis zu einigen Millisekunden) gekennzeichnet ist, und welches weder in seiner Intensität noch in seiner Abklingzeit vom zu messenden Parameter beeinflusst wird. Der zweite Indikator weist eine kürzerlebige Fluoreszenz

15 vorzugsweise im Bereich von einigen Nanosekunden auf, welche das langlebige Lumineszenzsignal überlagert, und deren Intensität eine Funktion des zu messenden Parameters ist. Mit Hilfe von Phasenmodulations- oder zeitaufgelösten Meßmethoden wird dabei eine Referenzgröße bestimmt, welche das Verhältnis der beiden einzelnen Lumineszenzintensitätsanteile

20 ausdrückt, wobei diese Referenzgröße unabhängig von der Gesamtintensität des Lumineszenzsignals ist, und damit die Referenzierung der kurzlebigen vom Analyten abhängigen Fluoreszenzkomponente ermöglicht.

Zitate

1. O.S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors Vol. II*, CRC press, 1991
2. S. Draxler, M.E. Lippitsch, *Sens. Actuators B*29, 199, 1995
3. J.R. Lakowicz, H. Szmecinski, *Sens. Actuators B*11, 133, 1993
4. J.R. Lakowicz, H. Szmecinski, M. Karakelle, *Anal. Chim Acta* 272, 179, 1993
5. J. Sipior, S. Bambot, M. Romauld, G.M. Carter, J.R. Lakowicz, G. Rao, *Anal. Biochem.* 227, 309, 1995
6. A. Mills, Q. Chang, *Analyst*, 118, 839, 1993
7. C. Preininger, G.J. Mohr, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 334, 113, 1996
8. U.E. Spichinger, D. Freiner, E. Bakker, T. Rosatzin, W. Simon, *Sens. Actuators B*11, 262, 1993

Ansprüche

1. Verfahren zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen,
5 chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe unter
Verwendung zumindest zweier verschiedener Leuchtstoffe (flu, ref),
deren erster (flu) zumindest in der Lumineszenzintensität auf den
Parameter anspricht und deren zweiter (ref) zumindest in der
Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf den Parameter nicht
10 anspricht,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu, ref) unterschiedliche Abklingzeiten
aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden
Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße (R) für die
15 Bestimmung des Parameters verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Referenzgröße ein Verhältnis (R) der beiden Lumineszenz-
20 intensitätsanteile verwendet wird, welches unabhängig von der
Gesamtintensität der Lumineszenzsignals ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die Abklingzeit des zweiten Leuchtstoffs (ref) länger ist als die
des ersten Leuchtstoffs (flu).
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die Leuchtstoffe (flu, ref) coimmobilisiert vorliegen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Referenzgröße (R) eine Phasenverschiebung (Φ_m) der
Lumineszenzantwort des ersten Leuchtstoffs (flu) zu der des zweiten
Leuchtstoffs (ref) verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Referenzgröße (R) aufgrund des Zeitverlaufs der
Lumineszenzantwort des zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Abklingzeit des ersten Leuchtstoffs (flu) im Bereich von 0,3
Nanosekunden bis zu etwa 100 Nanosekunden liegt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Leuchtstoff (ref) als Träger eines Untergrund-
Lumineszenzsignals fungiert, wobei insbesondere die Abklingzeit des
zweiten Leuchtstoffs (ref) im Bereich von 1 Nanosekunden bis 10
Millisekunden liegt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anregungs- oder/und Emissionsspektren der Leuchtstoffe
(flu,ref) einander überlappen.

- 19 -

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) gleichzeitig, insbesondere mit
gleichzeitigem Erregungsanfang oder/und gleicher Erregungsdauer,
erregt werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Parametermeßgröße (A_{flu}) sowie die Referenzgröße (A_{ref}) aus
einem Summensignal (A_{ges}) der sich ergebenden gemeinsamen
Lumineszenzantwort ermittelt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) durch eine einzige Lichtquelle
gemeinsam erregt werden.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Lumineszenzantworten der Leuchtstoffe (flu,ref) durch einen
einzigsten Detektor gemeinsam erfaßt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß als die Referenzgröße (R) die gemessene Phasenverschiebung
(Φ_m) des Summensignals (ges) aus Fluoreszenzsignal (flu) und
verzögertem Referenzsignal (ref) verwendet wird und somit das
Verhältnis der beiden Anteile widerspiegelt.

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Modulationsfrequenz auf die Abklingzeit des jeweiligen
längerlebigen Leuchtstoffs (ref) abgestimmt wird, und insbesondere
5 im Bereich zwischen 0,5 und 300 kHz liegt.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Referenzgröße (R) mit Hilfe einer zeitaufgelösten Messung
ermittelt wird, wobei die Referenzgröße (R) ein Verhältnis zwischen
10 der Lumineszenzintensität (I_1) während des Anregungsimpulses und
der Lumineszenzintensität (I_2) nach dem Ausschalten der Lichtquelle
darstellt.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) an der Oberfläche von Partikeln,
die den langlebigen Leuchtstoff (ref) enthalten, fixiert ist und die
Partikel ohne zusätzlichen Träger direkt in die Probe eingebracht
20 werden.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die in die Probe eingebrachten Partikel mit einem Flow-Cytometer
vermessen werden.
25
19. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die in die Probe eingebrachten Partikel mit einem Fluoreszenz-
30 mikroskop vermessen werden.

- 21 -

20. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Sensoren mit Hilfe von bildgebenden Methoden
zweidimensional ausgelesen werden.

5

21. Vorrichtung zur fluorometrischen Bestimmung eines biologischen,
chemischen oder physikalischen Parameters einer Probe, umfassend:
ein Sensormittel, das zumindest zwei verschiedene Leuchtstoffe
(flu,ref) aufweist, deren erster (flu) zumindest in der
Lumineszenzintensität auf den Parameter anspricht und deren zweiter
(ref) zumindest in der Lumineszenzintensität und der Abklingzeit auf
den Parameter nicht anspricht,

10

- dadurch gekennzeichnet,**
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) unterschiedliche Abklingzeiten
aufweisen und das Zeit- oder Phasenverhalten der sich ergebenden
Lumineszenzantwort zur Bildung einer Referenzgröße (R) für die
Bestimmung des Parameters verwendet wird.

15

22. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Abklingzeit des zweiten Leuchtstoffs (ref) länger ist als die
des ersten Leuchtstoffs (flu).

20

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) coimmobilisiert vorliegen.

25

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie die Referenzgröße (R) aufgrund einer Phasenverschiebung
(Φ_m) der Lumineszenzantwort des ersten Leuchtstoffs (flu) zu der des
zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt.

30

- 22 -

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Referenzgröße (R) aufgrund des Zeitverlaufs der
Lumineszenzantwort des zweiten Leuchtstoffs (ref) bestimmt wird.
- 5
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anregungs- oder/und die Emissionsspektren der Leuchtstoffe
(flu,ref) einander überlappen.
- 10
27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) gleichzeitig, insbesondere mit
gleichzeitigem Erregungsanfang oder/und gleicher Erregungsdauer,
erregt werden.
- 15
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Parametermeßgröße (A_{flu}) sowie die Referenzgröße (A_{ref}) aus
einem Summensignal (A_{ges}) der sich ergebenden gemeinsamen
Lumineszenzantwort ermittelt wird.
- 20
29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Leuchtstoffe (flu,ref) durch eine einzige Lichtquelle
gemeinsam erregt werden.
- 25
30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Lumineszenzantworten der Leuchtstoffe (flu,ref) durch einen
einzigsten Detektor gemeinsam erfaßt werden.
- 30

- 23 -

31. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der langlebige Leuchtstoff (ref) in einer Grundierungsschicht
immobilisiert ist, welche von der chemisch sensitiven Schicht, die
5 den kurzlebigen Leuchtstoff (flu) enthält, überzogen ist.
32. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der langlebige Leuchtstoff (ref) in pulverisierter Form vorliegt und
10 in einer chemisch sensitiven Schicht, die den kurzlebigen Leuchtstoff
(flu) enthält, dispergiert ist.
33. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß der langlebige Leuchtstoff (ref) zusammen mit dem kurzlebigen
Leuchtstoff (flu) in einer gemeinsamen Trägerschicht immobilisiert ist.
34. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß der langlebige Leuchtstoff (ref) an der Außenseite einer
Trägerschicht für die sensitive Schicht, die den kurzlebigen
Leuchtstoff (flu) enthält, immobilisiert ist.
35. Vorrichtung nach Anspruch 21,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) an der Oberfläche von Partikeln,
die den langlebigen Leuchtstoff (ref) enthalten, fixiert ist.
36. Vorrichtung nach Anspruch 35,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Partikel in eine für den zu messenden Parameter durchlässige
Matrix eingebettet sind.

37. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der langlebige Leuchtstoff (ref) aus der Gruppe der
lumineszierenden Übergangsmetallkomplexe mit Ru, Re, Os, Rh, Ir
oder Pt als Zentralatom und σ -Diiminliganden stammt.
38. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der langlebige Leuchtstoff (ref) aus der Gruppe der
phosphoreszierenden Porphyrine mit Pt, Pd, Lu und Sn als
Zentralatom stammt.
39. Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der langlebige Leuchtstoff (ref) ein phosphoreszierender Feststoff
wie Cr(II)-YAG oder Alexandrit ist.
40. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der insbesondere zur zeitaufgelösten Messung dienende
langlebigen Leuchtstoff in Sol-Gel eingebettet wird, welches
anschließend gesintert, gemahlen und in eine das kurzlebige
Leuchtstoff (flu) enthaltende sensitive Schicht eingebettet wird.
41. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zu messende chemische Parameter in der Probe der pH-Wert,
die Konzentration bestimmter verschiedener ionischer Verbindungen
wie z.B. Kalium, Calcium, Nitrat, Chlorid und verschiedener
Schwermetalle oder die Konzentration gasförmiger Komponenten wie
z.B. CO₂ und NH₃ oder das Redoxpotential ist.

42. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zu messende biologische Parameter ein mit
Fluoreszenzfarbstoffen markierter Antikörper oder Antigen ist.

5

43. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) ein pH-sensitiver
Fluoreszenzindikator ist.

10

44. Verfahren nach Anspruch 1 oder Vorrichtung nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß der kurzlebige Leuchtstoff (flu) ein chelatbildender
Fluoreszenzindikator ist.

15

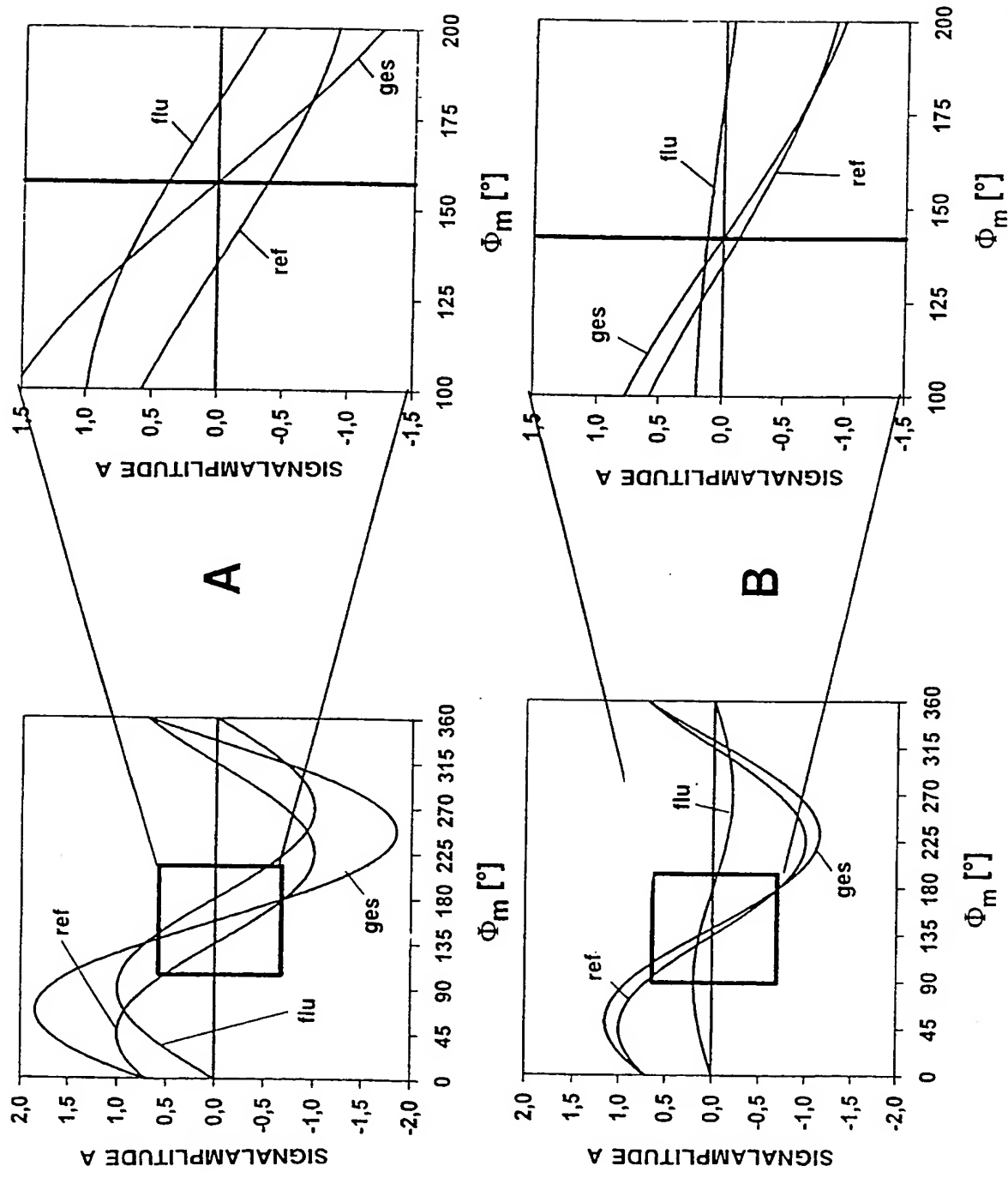


FIG. 1

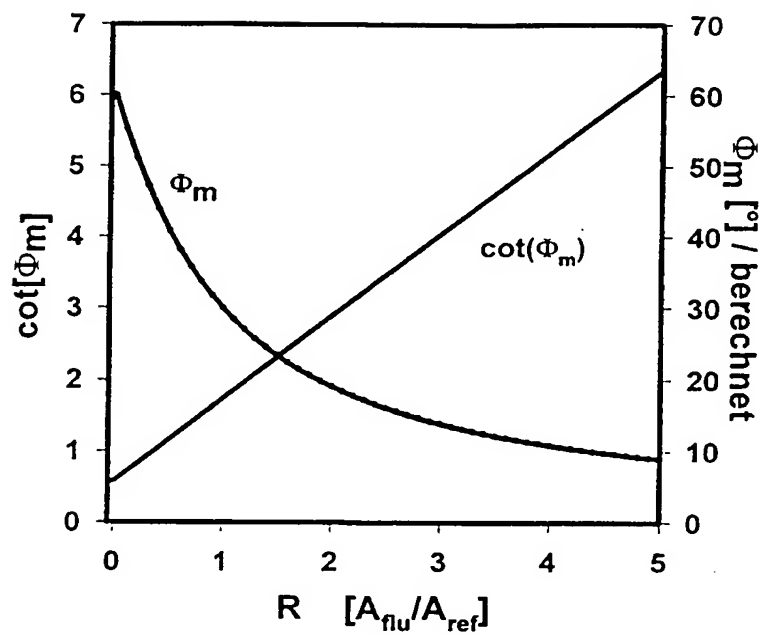


FIG. 2

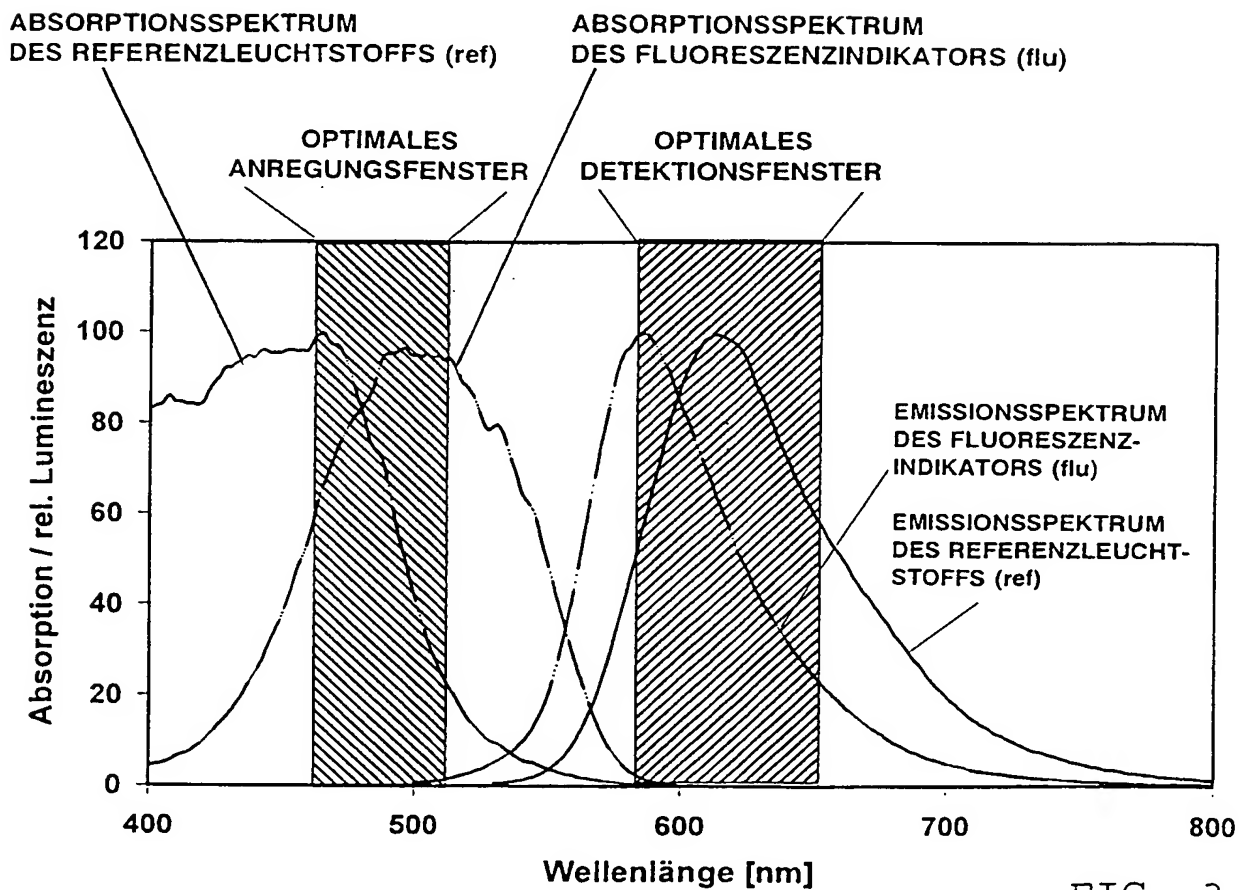


FIG. 3

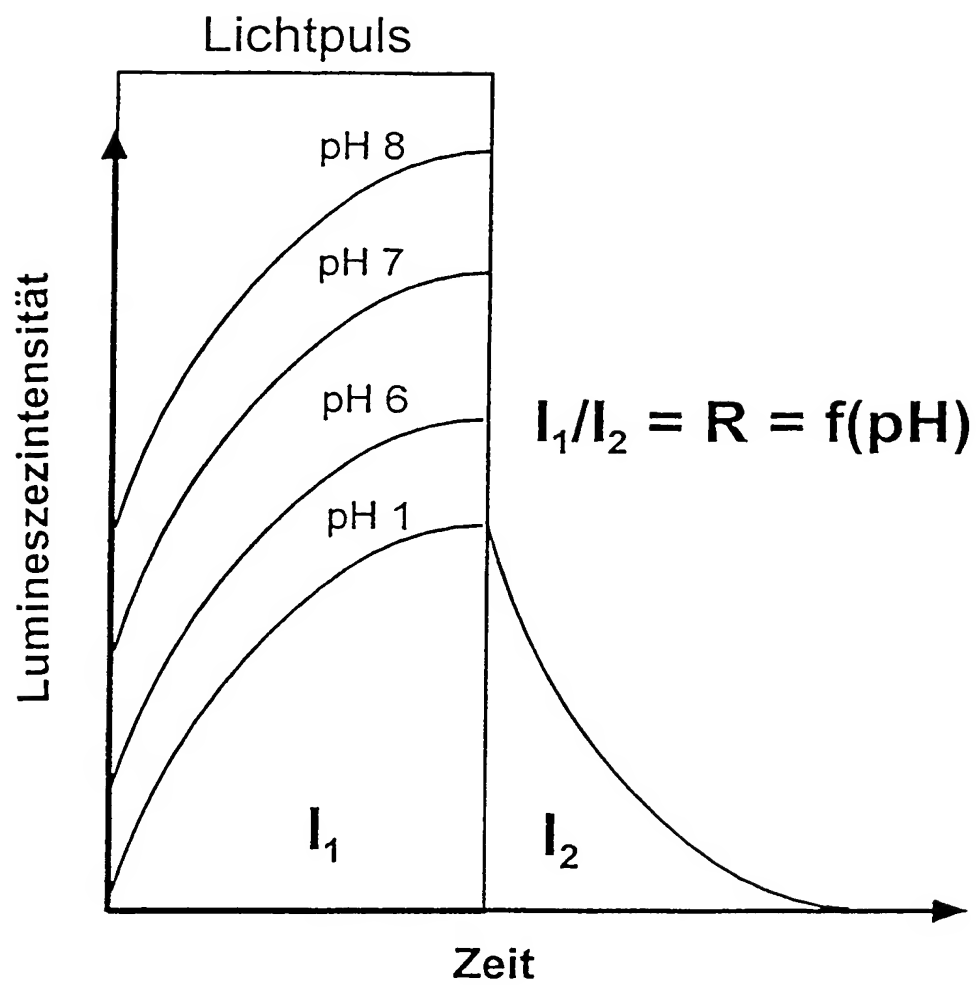


FIG. 4

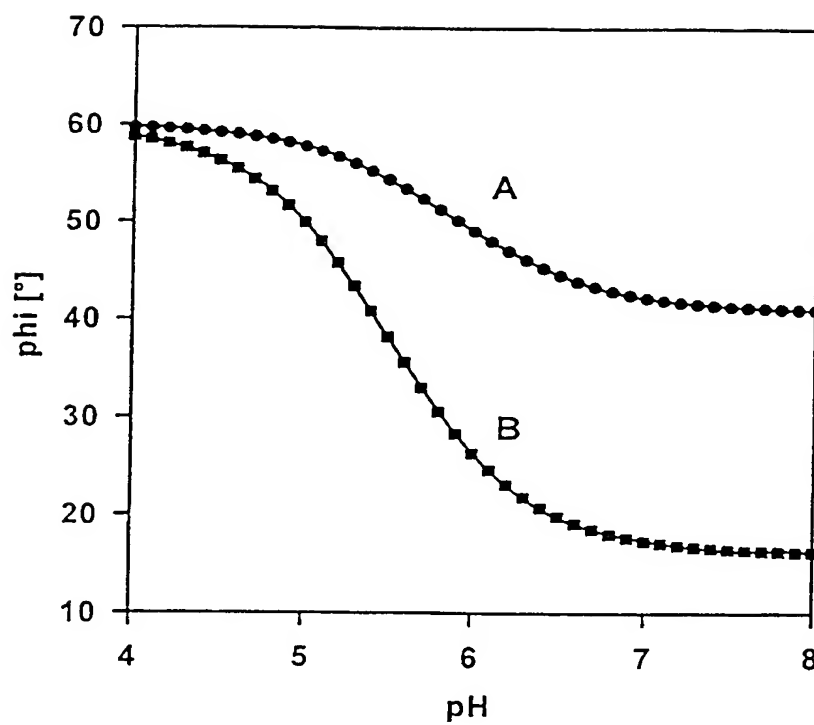


FIG. 5

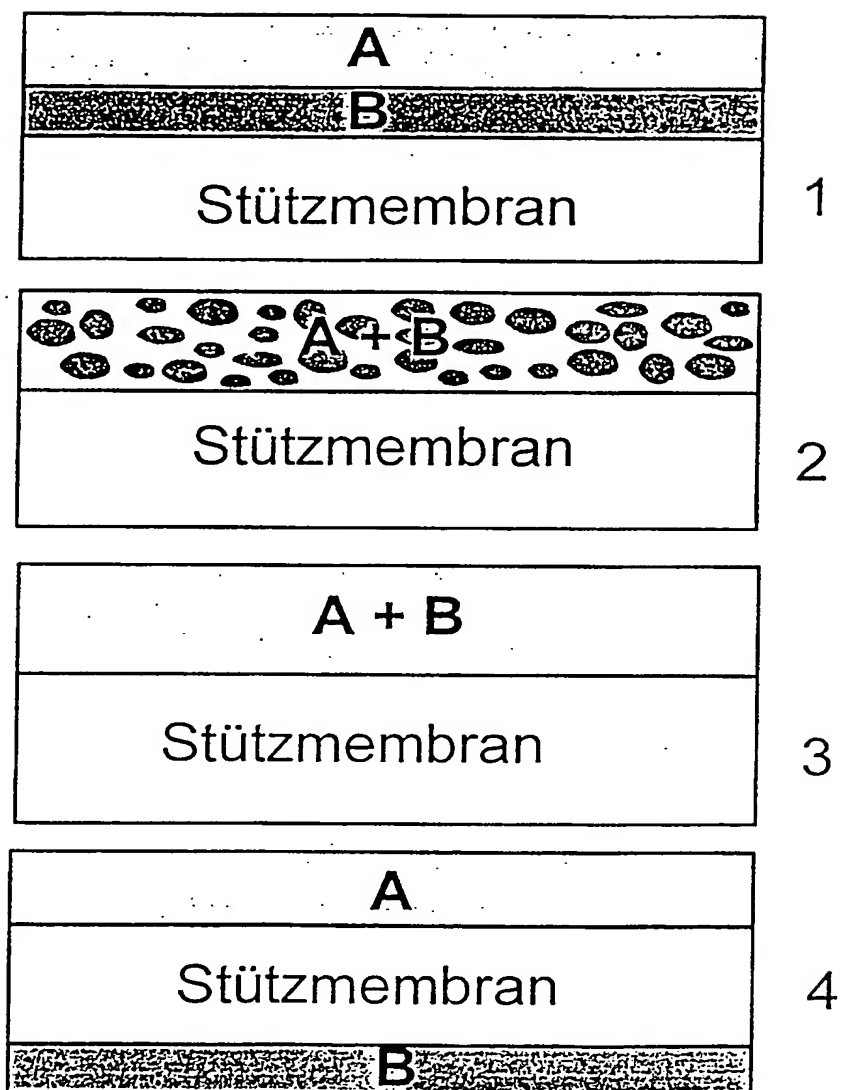


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N21/64

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 618 732 A (PEASE) 8 April 1997	1-4, 6, 17, 21-23, 27, 35, 42
A	see column 7, line 39 - line 59 see column 9, line 6 - line 54 see column 18, line 11 - line 38 see column 23, line 45 - line 53 see column 24, line 12 - line 13 see column 24, line 34 - line 39 see column 25, line 35 - line 40 see column 25, line 62 - line 67 see column 33, line 6 - line 8 see column 42, line 18 - line 25	37, 38
Y	see column 49, line 55 - column 50, line 27; claim 1	5, 7-10, 12, 13, 24, 26, 27, 29-36,
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1998

Date of mailing of the international search report

01/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thomas, R.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 98/04779

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 95 10766 A (MINNESOTA MINING) 20 April 1995</p> <p>see page 1, paragraph 1 see page 4, line 8 - line 28 see page 21, line 28 - page 22, line 26 see page 28, line 35 - page 29, last line</p>	<p>40,41</p> <p>5,7-10, 12,13, 24,26, 27,29, 30,41</p>
Y	<p style="text-align: center;">---</p> <p>EP 0 354 204 A (AVL) 7 February 1990 see column 3, line 64 - column 7, line 7 see column 4, line 10 - line 14 see column 5, line 52 - line 57</p>	31,32,40
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>see figure 3</p>	36,41,43
Y	<p style="text-align: center;">---</p> <p>US 5 580 749 A (HUGHES) 3 December 1996 see column 1, line 11 - line 30 see column 3, line 45 - line 55</p>	33-36
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 97 10495 A (OPTICAL SENSORS) 20 March 1997</p> <p>see abstract see page 2, line 18 - line 22 see page 15, line 17 - line 19 see page 16, line 20 - line 33 see page 17, line 5 - line 8 see page 20, line 6 - line 28</p>	10,13, 15,30, 41,43
A	<p style="text-align: center;">---</p> <p>WO 92 04618 A (FIBERCHEM) 19 March 1992 see abstract see page 7, line 10 - line 15 see page 7, line 25 - page 8, line 6</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04779

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5618732	A	08-04-1997	AT 162892 T	15-02-1998
			CA 2141451 A	17-02-1994
			DE 69316757 D	05-03-1998
			DE 69316757 T	07-05-1998
			EP 0653066 A	17-05-1995
			ES 2113547 T	01-05-1998
			JP 9502253 T	04-03-1997
			WO 9403812 A	17-02-1994
			US 5709994 A	20-01-1998
WO 9510766	A	20-04-1995	US 5462879 A	31-10-1995
			AT 164944 T	15-04-1998
			CN 1133088 A	09-10-1996
			DE 69409549 D	14-05-1998
			DE 69409549 T	19-11-1998
			EP 0760093 A	05-03-1997
			JP 9503866 T	15-04-1997
			US 5518694 A	21-05-1996
EP 0354204	A	07-02-1990	AT 390517 B	25-05-1990
			AT 197488 A	15-10-1989
			DE 58909153 D	11-05-1995
			DK 376389 A	05-02-1990
			JP 1950767 C	10-07-1995
			JP 2167448 A	27-06-1990
			JP 6082100 B	19-10-1994
			US 5114676 A	19-05-1992
US 5580749	A	03-12-1996	NONE	
WO 9710495	A	20-03-1997	US 5672515 A	30-09-1997
			EP 0850409 A	01-07-1998
WO 9204618	A	19-03-1992	US 5094958 A	10-03-1992
			CA 2089649 A	01-03-1992
			EP 0545949 A	16-06-1993
			JP 6500390 T	13-01-1994

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Ir al Aktenzeichen

PCT/EP 98/04779

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N21/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 618 732 A (PEASE) 8. April 1997	1-4, 6, 17, 21-23, 27, 35, 42
A	siehe Spalte 7, Zeile 39 - Zeile 59 siehe Spalte 9, Zeile 6 - Zeile 54 siehe Spalte 18, Zeile 11 - Zeile 38 siehe Spalte 23, Zeile 45 - Zeile 53 siehe Spalte 24, Zeile 12 - Zeile 13 siehe Spalte 24, Zeile 34 - Zeile 39 siehe Spalte 25, Zeile 35 - Zeile 40 siehe Spalte 25, Zeile 62 - Zeile 67 siehe Spalte 33, Zeile 6 - Zeile 8	37, 38
Y	siehe Spalte 42, Zeile 18 - Zeile 25 siehe Spalte 49, Zeile 55 - Spalte 50, Zeile 27; Anspruch 1	5, 7-10, 12, 13, 24, 26, 27, 29-36,
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. November 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thomas, R.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>----</p> <p>WO 95 10766 A (MINNESOTA MINING) 20. April 1995</p> <p>siehe Seite 1, Absatz 1 siehe Seite 4, Zeile 8 - Zeile 28 siehe Seite 21, Zeile 28 - Seite 22, Zeile 26 siehe Seite 28, Zeile 35 - Seite 29, letzte Zeile</p>	<p>40,41</p> <p>5,7-10, 12,13, 24,26, 27,29, 30,41</p>
Y	<p>----</p> <p>EP 0 354 204 A (AVL) 7. Februar 1990 siehe Spalte 3, Zeile 64 - Spalte 7, Zeile 7 siehe Spalte 4, Zeile 10 - Zeile 14 siehe Spalte 5, Zeile 52 - Zeile 57 siehe Abbildung 3</p>	<p>31,32,40</p>
A	<p>----</p> <p>US 5 580 749 A (HUGHES) 3. Dezember 1996 siehe Spalte 1, Zeile 11 - Zeile 30 siehe Spalte 3, Zeile 45 - Zeile 55</p>	<p>36,41,43</p>
Y	<p>----</p> <p>US 5 580 749 A (HUGHES) 3. Dezember 1996 siehe Spalte 1, Zeile 11 - Zeile 30 siehe Spalte 3, Zeile 45 - Zeile 55</p>	<p>33-36</p>
A	<p>----</p> <p>WO 97 10495 A (OPTICAL SENSORS) 20. März 1997</p> <p>siehe Zusammenfassung siehe Seite 2, Zeile 18 - Zeile 22 siehe Seite 15, Zeile 17 - Zeile 19 siehe Seite 16, Zeile 20 - Zeile 33 siehe Seite 17, Zeile 5 - Zeile 8 siehe Seite 20, Zeile 6 - Zeile 28</p>	<p>10,13, 15,30, 41,43</p>
A	<p>----</p> <p>WO 92 04618 A (FIBERCHEM) 19. März 1992 siehe Zusammenfassung siehe Seite 7, Zeile 10 - Zeile 15 siehe Seite 7, Zeile 25 - Seite 8, Zeile 6</p> <p>-----</p>	<p>1,2,21</p>

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Klass. Zeichen

PCT/EP 98/04779

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5618732 A	08-04-1997	AT 162892 T	15-02-1998
		CA 2141451 A	17-02-1994
		DE 69316757 D	05-03-1998
		DE 69316757 T	07-05-1998
		EP 0653066 A	17-05-1995
		ES 2113547 T	01-05-1998
		JP 9502253 T	04-03-1997
		WO 9403812 A	17-02-1994
		US 5709994 A	20-01-1998
WO 9510766 A	20-04-1995	US 5462879 A	31-10-1995
		AT 164944 T	15-04-1998
		CN 1133088 A	09-10-1996
		DE 69409549 D	14-05-1998
		DE 69409549 T	19-11-1998
		EP 0760093 A	05-03-1997
		JP 9503866 T	15-04-1997
		US 5518694 A	21-05-1996
EP 0354204 A	07-02-1990	AT 390517 B	25-05-1990
		AT 197488 A	15-10-1989
		DE 58909153 D	11-05-1995
		DK 376389 A	05-02-1990
		JP 1950767 C	10-07-1995
		JP 2167448 A	27-06-1990
		JP 6082100 B	19-10-1994
		US 5114676 A	19-05-1992
US 5580749 A	03-12-1996	KEINE	
WO 9710495 A	20-03-1997	US 5672515 A	30-09-1997
		EP 0850409 A	01-07-1998
WO 9204618 A	19-03-1992	US 5094958 A	10-03-1992
		CA 2089649 A	01-03-1992
		EP 0545949 A	16-06-1993
		JP 6500390 T	13-01-1994